

Clostridium difficile の産生する易熱性細胞毒素の部分精製と生物学的活性

金沢大学医学部小児科学教室 (主任: 谷口 昂教授)

岩 城 進

(昭和57年9月6日受付)

Clostridium difficile による下痢発症の機序を解明するために、その毒素の精製が試みられた。*C. difficile* ATCC 17859 を brain heart infusion broth で大気中 37°C 5 日間の静置培養を行い、その上清を粗毒素液として実験に供した。粗毒素液は濃縮後、細胞 (Y1 adrenal cell, Hela cell) への cytopathic effect (以下 CPE と略) 活性物質の部分精製を行った。この毒素による細胞形態変化を追求し、下痢発症の機序に関して興味ある事実を認めた。即ち、粗毒素液の Sephadex G 200 カラムによるゲルろ過後 CPE 活性をもつ画分を diethyl aminoethyl cellulose カラムにかけて、0.1 M NaCl での溶出画分 (画分 I) と 0.1 M~1.0 M NaCl での直線勾配溶出画分 (画分 II) に分離し、それぞれの CPE 活性を細胞形態学的にみると、画分 I は 5 分間接触法で Hela cell への CPE を認めず Y1 adrenal cell への CPE を認め、且つその CPE は円形細胞化で培地交換により細胞の復元を認めるという cytotoxicity 型を示したが、画分 II は 5 分間接触法で両細胞への CPE を認め、かつその CPE は濃縮核、細胞剥離、細胞縮化で培地交換により細胞の復元を認めないという cytotoxicity 型を示した。また、画分 I は Y1 adrenal cell で cyclic AMP 産出作用を認め、in vivo 系としてのウサギ小腸結紮ループ法で水様透明の体液貯留、乳飲みマウス法で体液貯留を認めた。一方画分 II はウサギ小腸結紮ループ法で血液混入の暗赤色体液貯留を認め、乳飲みマウス法での体液貯留と Y1 adrenal cell での cyclic AMP 産出作用は認めなかった。またさらに、両者とも 56°C 30 分加熱により毒素活性の失活を認めるという易熱性とマウス致死性 (前者が後者より大) を認めた。これらから、感染した *C. difficile* の産生する cytotoxicity と cytotoxicity の 2 つの型の毒素により臨床像が修飾される可能性が示唆される。

Key words *C. difficile* toxin, Heat labile toxin, Cytotoxicity type, Cytotoxicity type, Cyclic AMP.

ハムスターのクリンダマイシンに起因する腸炎は *C. difficile* が腸内に異常増殖し該菌の外毒素によりひきおこされるということが、Bartlett ら¹⁾により報告された。その後更に、人の抗生剤による偽膜性腸炎や重症下痢症に *C. difficile* toxin が証明されるという報告がなされるようになった²⁾⁻⁸⁾。この毒素は易熱性で、Hela cell と FL cell, Y1 adrenal cell の細胞変性をひきおこし⁹⁾、ウサギ皮膚の血管透過性を高め、ウサギ小腸結紮ループ法と乳飲みマウス法で各々の小腸内に体液貯留をひきおこし、毒素の静脈内投与によりマウスを致死に至

らしめるといった性状が知られるようになった¹⁰⁾⁻¹²⁾。以上の種々の作用を示す毒素の本態を明らかにするために *C. difficile* toxin の精製が進められ、Rolf ら¹⁰⁾は単一の毒素成分を報告しているが、最近 Taylor ら¹¹⁾は 2 種類の毒素を報告しており、それらの分子量も推定されるようになった。

著者も *C. difficile* toxin 精製の過程で 2 つの易熱性細胞毒素を見出し、その生物学的活性を Sack ら¹³⁾の 5 分間接触法を一部修正して比較検討した。各毒素の Y1 adrenal cell と Hela cell に対する態度に差異を認め、

Partial Purification and Biological Characteristics of Heat Labile Cytotoxin of *Clostridium Difficile*. Susumu Iwaki, Department of Pediatrics (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University.

目つその差異と in vivo での病原性を調べ、興味ある事実、特にウサギ小腸結紮ループ法での貯留体液の性状と乳飲みマウスでの体液貯留、Y1 adrenal cell での cyclic AMP 産出に差異を見出したので、若干の考察を加えここに報告する。

材料及び方法

I. 試供菌株

試供菌株は金沢大学医学部微生物学教室（西田尚紀教授、中村信一助教授）より分与を受けた *C. difficile* 3株（ATCC 17859, KZ 57, KZ 101）である。

II.

II. 毒素の精製法 (Fig. 1)

1. 前培養

嫌気培養装置（トミー精工：N₂ 90%，CO₂ 5%，H₂ 5%）内で brain heart infusion (BHI)（以下 BHI と略）agar で 48 時間培養した *C. difficile* の単一集落を、中試験管に 10 ml あて分注した BHI broth へ 1 白金耳接種し、前記嫌気培養装置内で 37°C 12 時間静置培養した。この培養液を毒素産生用培地への接種菌液とした。

2. 毒素液の作製

BHI broth を 20 ml 用試験管 270 本に約 15 ml ずつ分注した。各々にシリコン栓（信越ポリマー kk）をし、121°C 15 分加熱により滅菌し、その後直ちに水道水で急速冷却した。これらに前培養した菌液 0.2 ml ずつを接種し、37°C 5 日間特に嫌気性の処理を行わず大気下で静置培養した。培養液 3.2 l を 4°C で 12000×g 15 分間遠心し、得られた上清を 0.45 μm membrane filter（Millipore Corp.: Bedford, Mass.）でろ過し菌体成分を除去した。これを粗毒素液とした。この内、毒素の精製には ATCC 17859 株のみを用いた。

3. 毒素の精製

粗毒素液を透析膜（pore size: 15 Å, ビスキング、白井松器機 kk, 東京）内に入れ、室温風で約 10 分の 1 量に濃縮した。ついで 70% (W/V) 飽和硫酸液で 12 時間塩析後、4°C で 12000×g 15 分間遠心し、沈澱部分を集めた。これを 0.1 M Tris-HCl buffer-0.2 M NaCl, pH 8.0 で 48 時間透析後 Mini-Con B15（Amicon Corp.: Lexington, Mass.）で 5 ml 以内に濃縮し、再び同透析液で 24 時間透析し約 7.0 ml を得た。

1) Sephadex G 200 カラムによるゲルろ過

前記約 7.0 ml を Sephadex G 200 カラム（φ 5.0×90 cm）を用い 0.1 M Tris-HCl buffer-0.2 M NaCl, pH 8.0 によりゲルろ過した。ろ過液を 1 本 10 ml の画分として順次試験管に分注し各々の画分について cyto-

pathic effect（以下 CPE と略）（後記）と蛋白濃度を調べ、CPE 活性を認める画分を集めた。

2) Diethyl aminoethyl-cellulose カラムによるクロマトグラフィー

前記のゲルろ過により得られた CPE 活性画分液合計 100 ml を Mini-Con B15 で約 2 ml に濃縮後、0.1 M Tris-HCl buffer-0.1 M NaCl, pH 8.0 で 24 時間透析し約 3.0 ml を得た。これを同緩衝液使用の DEAE cellulose カラムにかけ、3 ml ずつ分取し、蛋白濃度を各々の画分について測定した。蛋白濃度が認められなくなるまで溶出した後、更に 0.1 M~1.0 M NaCl (0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0) での直線勾配をかけ、3 ml ずつ分取し、蛋白濃度が再び認められなくなるまで溶出した。以上により得られた画分の各々の CPE 活性を調べ、CPE 活性画分を部分精製された毒素とし、他の生物学的活性を測定した。

III. *C. difficile* toxin の生物学的活性測定法

1. 細胞変性効果の検定

HAM F-12 培地（日水）に牛血清（GIBCO）12.5% (V/V), 牛胎児血清（GIBCO）2.5% (V/V), カナマイシン 100 μg/ml, 重曹 0.08% (W/V) 添加した組織培養用培地を用い Y1 adrenal cell と Hela cell の継代培養を行った。これらの細胞を各々 96 穴組織培養用マイクロプレート（Falcon Plastics, 東京）に移し、5% 炭酸ガス恒温器内で 37°C で 18~24 時間培養し、単一層になったところで検定に供した。毒素液は pH 7.2, 0.15 M の燐酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline, 以下 PBS と略）で倍々希釈したものを用い、次の 2 種類の方法により CPE を検定した。

1) 5 分間接触法

Sack ら¹³⁾の方法を一部修正して CPE の検定を行った⁹⁾。即ち、各々 12 μl の毒素希釈液をマイクロプレート上で均一層になった各々の組織培養細胞の上に注ぎ、5 分後培養細胞を PBS で洗浄しその後直ちに前記組織培養用培地を添加し、5% 炭酸ガス恒温器内で 37°C で培養を続け、24 時間後倒立顕微鏡下でその形態変化を観察した¹⁴⁾¹⁵⁾。

2) 24 時間混合培養法

毒素希釈液を培養組織細胞の上に注ぐまでは前法と同様であるが、その後はそのまま 5% 炭酸ガス恒温器内で 37°C で培養を続け、24 時間後倒立顕微鏡下でその形態変化を観察した。

5 分間接触法、24 時間混合培養法とも活性の強さは 50% CPE を起こすのに要する希釈度の逆数 (reciprocal of cytotoxin dilution (log 2)), 以下 RCD と略) で表現した。

2. マウス致死活性

毒素液 0.25 ml を体重 25 g 前後の DDY 系雌マウスに尾静脈注射を行い、48 時間後マウス致死の有無を観察した。判定は毒素サンプル 1 種につき 3 匹のマウスを使い 2 匹以上の致死を認めた場合を陽性とし、活性度はマウス致死の最小量 (minimal lethal dose, 以下 MLD と略) で表現した。

3. ウサギ小腸結紮ループ法 (ileal loop test, 以下 ILT と略)

De ら¹⁶⁾の方法を改変した渡部ら¹⁷⁾の方法に従った。即ち、体重 1.5~2.0 kg の雄白ウサギを実験 2 日前より絶食とし水分だけはそのまま与えた。チオペンタール Na (ラボナール, ㊟タナベ) の静脈麻酔下で開腹し、回腸の虫垂の結合部より 30 cm 口吻側で結紮しその場所を起点として 10 cm のループを作り、各ループ間に 5 cm の間隔を設けて順次口吻側に向ってループを作製した。それらのループに毒素液 1.0 ml 注入後腸管を腹腔に戻し、腹膜、筋層、皮膚の順に各々縫合した。約

18 時間後屠殺し、再び開腹後腸管を取り出して各ループ毎に切り離しその重量を測定した。長さあたりの重量比 (g/cm) を算出し 0.2 以上を陽性とした。

4. 乳飲みマウスの体液貯留法 (suckling mouse assay)¹⁸⁾¹⁹⁾

生後 4 日以内の乳飲みマウスに毒素液 0.1 ml を 22 G のサーフロー留置針 (テルモジャパン kk, 東京) により経口的に注入した。5 時間後開腹して小腸内の体液貯留をみた。判定は貯留部分の小腸重量と全身の重量比を算出して 0.06 以上を陽性とした。

5. Y1 adrenal cell 接触による cyclic AMP の測定

Y1 adrenal cell を 50 ml 用プラスチック製培養瓶 (スーコ社-1461) に培養し単一層になったところで検定に供した。毒素液は Y1 adrenal cell 上に注いだ場合、3~4 時間で細胞形態変化 (円形細胞化又は濃縮核、細胞剝離、細胞縮化) を認めるように希釈したものを

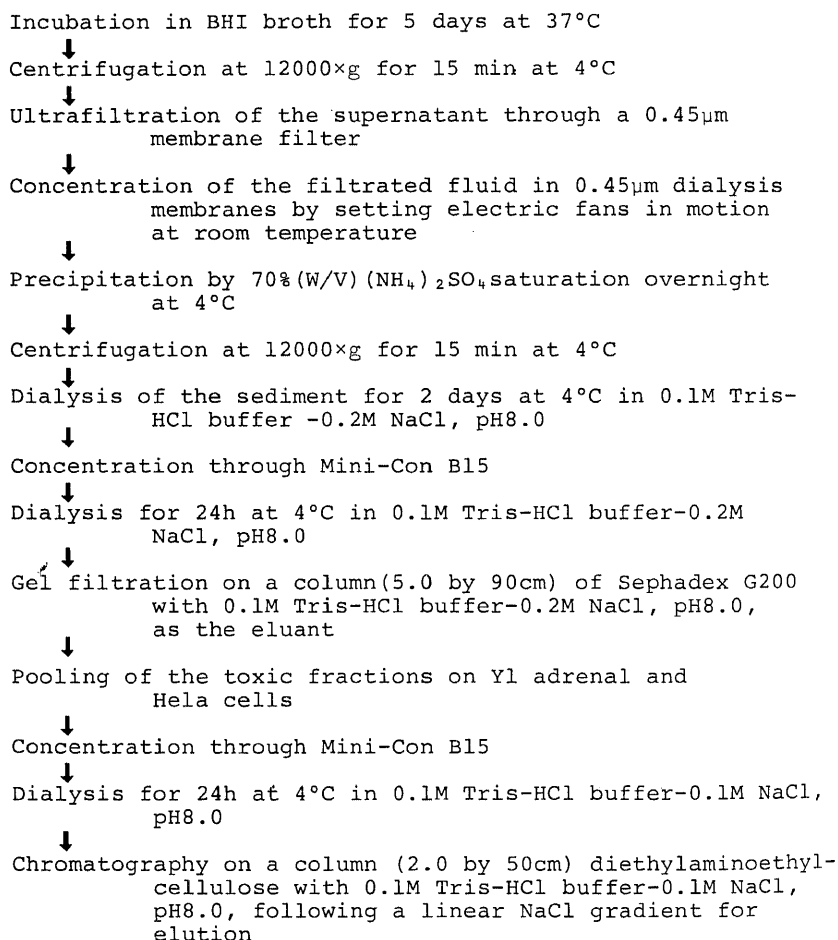


Fig. 1. Purification and fractionation of *Clostridium difficile* toxin.

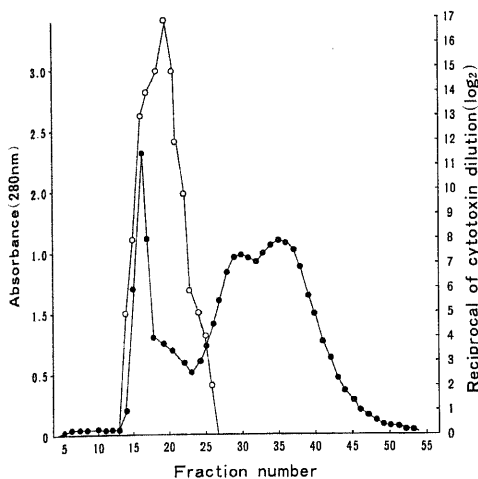


Fig. 2. Gel filtration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -precipitated protein on a Sephadex G 200 column (5.0 by 90cm) with 0.1 M Tris-HCl buffer - 0.2 M NaCl, pH 8.0, as the eluant. The 7.0ml sample, applied to the column, contained 547.75mg of protein. Symbols: ●, absorbance at 280nm, ○, reciprocal of cytotoxin dilution (\log_2). Fractions of No. 14 to No. 23 were applied to a column of diethylaminoethyl-cellulose.

使用した。Y1 adrenal cell 上に前記希釈毒素液 0.5 ml を注ぎ、5 分後毒素液を吸引し、直ちに PBS で洗浄後組織培養用培地 5 ml 添加したこの培養瓶を密栓し、37°C で再び培養した。培養瓶は 15 個用いて行った。毒素液を注ぐ前と、毒素液を注いだ後順を追って 1 時間毎 12 時間目まで 1 ケずつ培養瓶を取り出し各々の時間に次の操作を行った。5 ml の培地を吸引後 4°C に冷却したエタノール 5 ml を培養瓶の中に加え、直ちに機械的に細胞を剥がした後これを 100°C の熱湯内へ 3 分間つけ、その後室温中に放置した。これを温度が室温程度に下降した後に 400×g 10 分間遠心して上清と沈澱に分離し、下記のごとく cyclic AMP を測定した。

1) 上清は、水分を 50°C で蒸発させ、残った固形分に 0.05 M sodium acetate buffer (pH 4.0) 2.0 ml を加え室温に 20~30 分放置した。これを YAMASA Cyclic AMP Assay Kit (RI 法) (ヤマサ醤油 kk, 東京) を用い、その cyclic AMP の量を測定した²⁰⁾。

2) 沈澱は 0.1 N NaOH 2.0 ml を加え、その蛋白量を牛アルブミンをコントロールとして 280 nm の吸光度により測定した。

蛋白量あたりの cyclic AMP の量は 1) と 2) より得られた数値の比として算出し、単位は pico mol/mg protein とした。

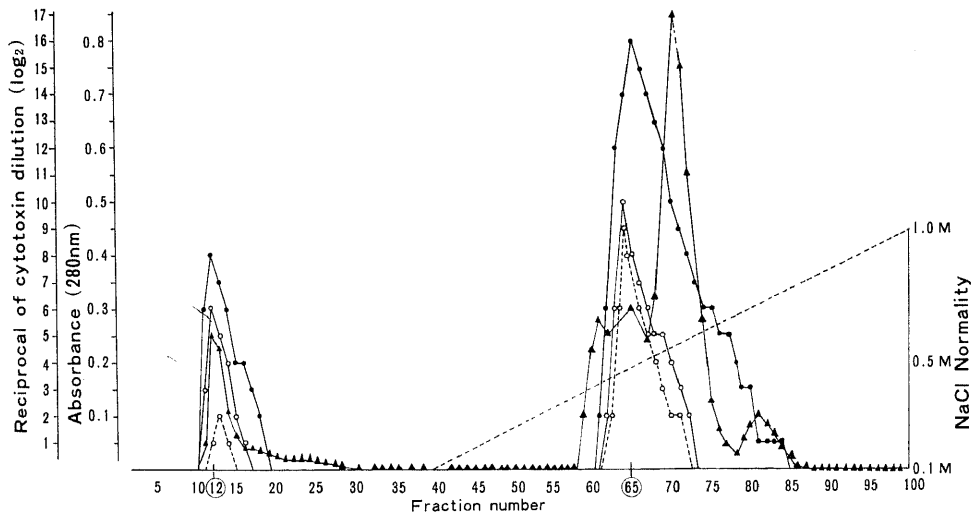


Fig. 3. Chromatography of the fractions ranging between No. 14 and No. 23 in the Sephadex G 200 column (Fig. 2) on a column (2.0 by 50cm) of diethylaminoethyl-cellulose. A linear gradient of NaCl was used for elution. Symbols: ▲—▲, absorbance at 280nm; -----, NaCl normality; ●—●, reciprocal of cytotoxin dilution (\log_2) by 24h mixed culture method (Y1 adrenal cell and Hela cell); ○—○, reciprocal of cytotoxin dilution (\log_2) by 5min agitation method (Y1 adrenal cell); ○—○, reciprocal of cytotoxin dilution (\log_2) by 5min agitation method (Hela cell).

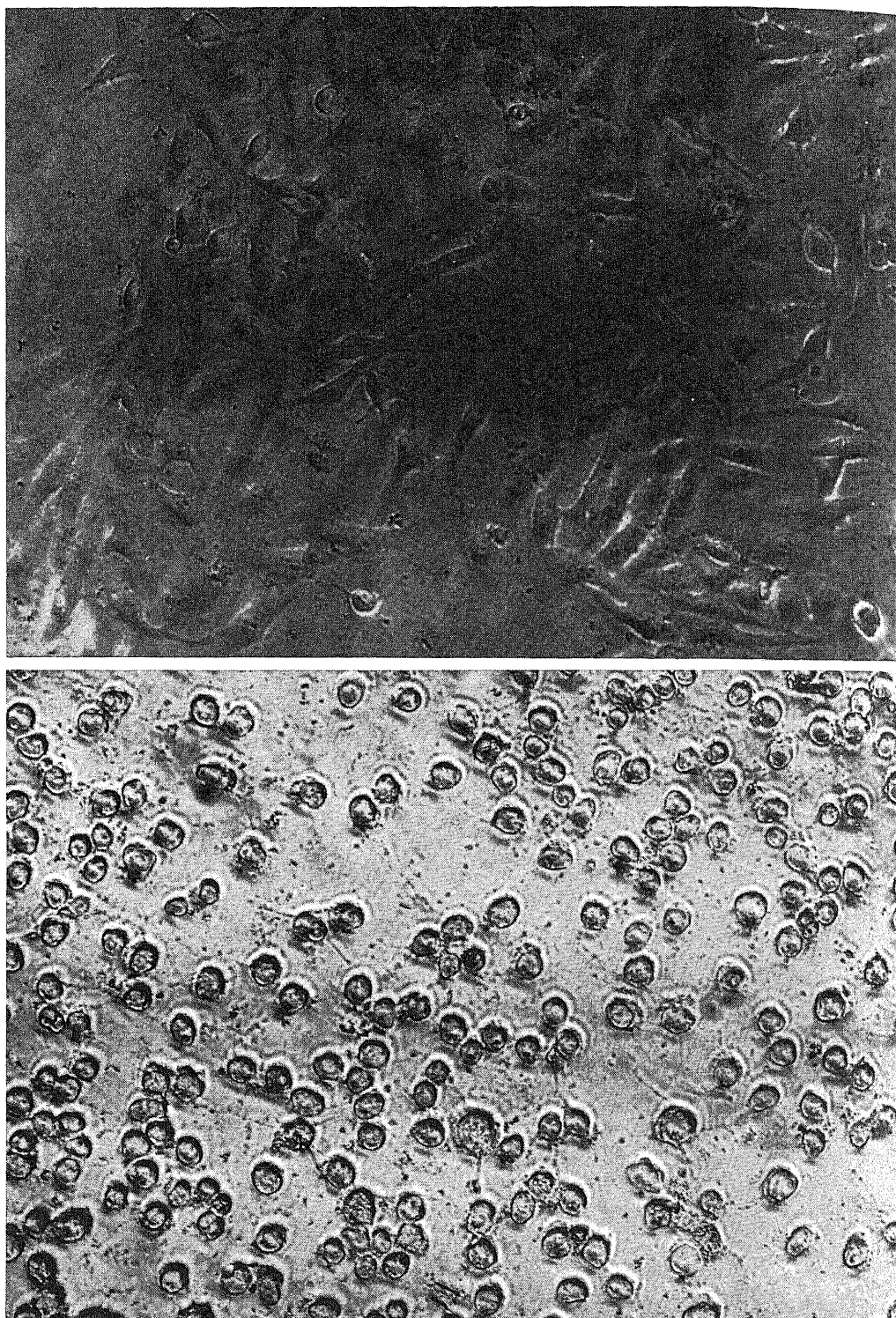


Fig. 4a. Effect on HeLa cells of *C. difficile* culture filtrates by 24h mixed culture method. A, negative cytotoxin showing no change from control cells; B, cytotoxicity type producing cell death manifested by pyknotic nuclei, loss of adherence and cell shrinkage.

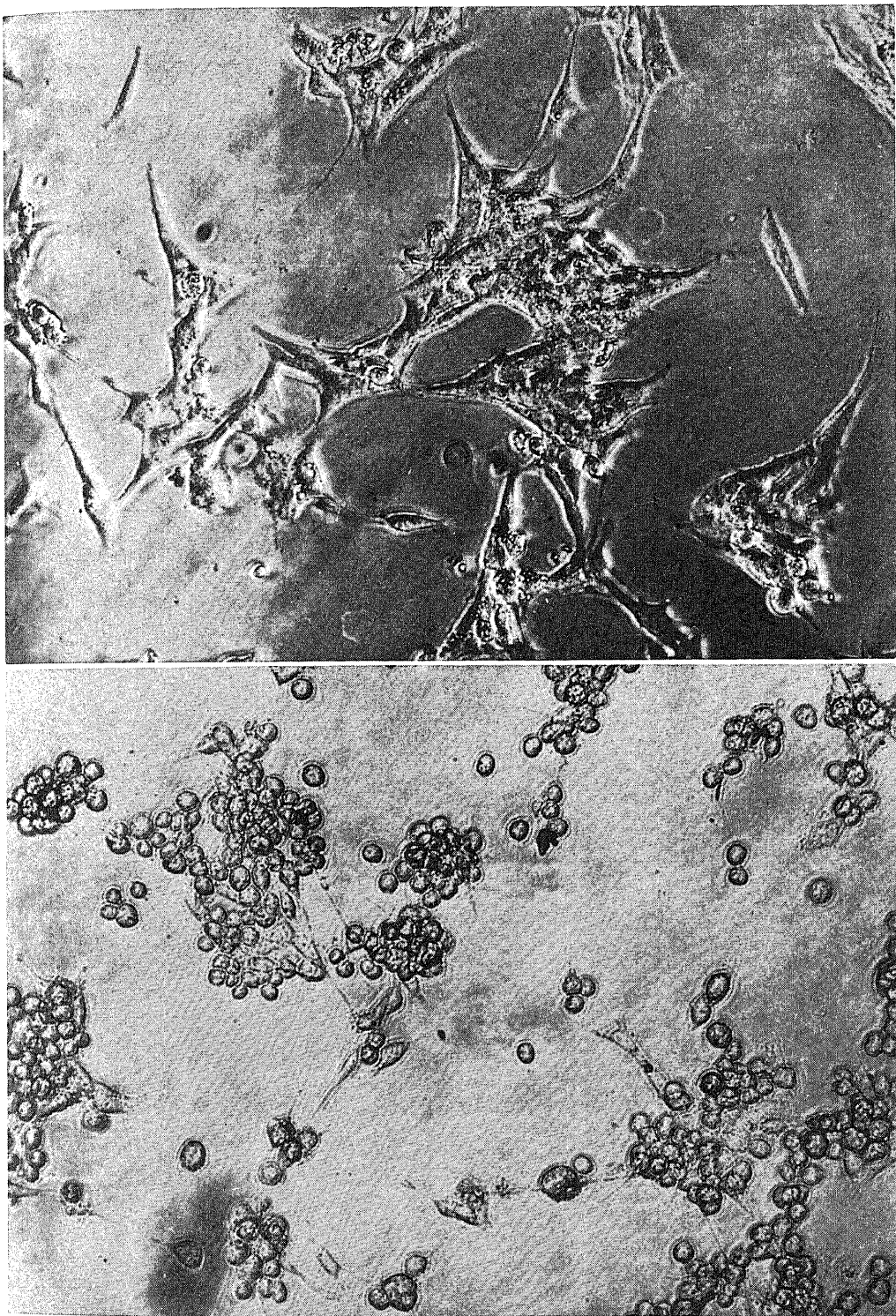


Fig. 4b. Effect on Y1 adrenal cells of *C. difficile* culture filtrates by 5min agitation method. A, negative cytotoxin showing no change from control cells; B, cytotoxicity type producing numerous rounded cells without loss of adherence.

成 績

I. Sephadex G 200 カラムのゲルろ過による画分の成績

C. difficile (ATCC 17859) を BHI broth で特に嫌気性の処理を行わず大気下 37°C 5 日間静置培養し、培養液 3.2 l を得た。これを遠心とフィルターろ過による菌体成分除去後、濃縮、塩析、透析により 7.0 ml を得た。これを Sephadex G 200 カラムを使い 0.1 M Tris-HCl buffer - 0.2 M NaCl, pH 8.0 でゲルろ過し、得られた画分の各々につき CPE 活性と蛋白濃度を測定した。(Fig. 2)。その結果、No.14~No.26 の画分に CPE 活性があることが次の如く判明した。

1. 24 時間混合培養法による 2 種の細胞の CPE

Y1 adrenal cell と Hela cell の 2 種の細胞を用い 24 時間混合培養法で CPE を検定した。その結果、両者とも形態変化は濃縮核、細胞剥離、細胞縮化で、PBS で洗浄し組織培養用培地を添加し培養を続けても復元傾向を認めないという cytotoxicity 型¹⁴⁾¹⁵⁾であった(Fig. 4 a)。変性の開始は画分により異なるが、早いものは接触後 30 分より始まり RCD は各々 12~18 時間後に最大値を認めた。また、この CPE は毒素液を 56°C 30 分加熱することにより失活した。

2. 各画分毎の RCD と蛋白濃度

RCD はピークが 1 峰性 (No.14~No.26 の画分) に認められ、最大は No.19 の画分に RCD 17 を認めた。蛋白濃度はピークが 3 峰性に認められ、最大は No.16 の画分に absorbance 2.36 を示し、且つ RCD の 1 峰性ピ

Table 1. Several characteristics of *C. difficile* ATCC 17859 cytotoxin. Fractions of No. 12 and No. 65 of partially purified *C. difficile* cytotoxin on a column of DEAE cellulose (Fig. 3) were used. RCD, reciprocal of cytotoxin dilution.

Fraction	No.12		No.65	
Normality of NaCl for elution in DEAE cellulose column	0.1M		0.45M	
RCD(log2) by	in Y1 adrenal cells	in Hela cells	in Y1 adrenal cells	in Hela cells
{ 24h mixed culture method	8	8	16	16
{ 5min agitation method	6	1	10	9
Protein concent (absorbance) at 280nm	0.25		0.30	
Inactivation with heating at 56°C for 30 min.	(+)		(+)	
Minimal lethal dose in mouse. RCD(log10)	3		1	
Ileal loop test				
activity in rabbit				
•RCD(log10)	3		3	
macroscopic appearance of intestinal lesion	watery transparent liquid		dark color liquid with blood	
Suckling mouse assay				
•RCD(log10) 0~2	lethal		lethal	
•RCD(log10) 3	watery transparent liquid		no change	
Cyclic AMP production in Y1 adrenal cells	positive		negative	

ークに属した。また、総蛋白量は 547.75 mg で、No. 14~No.26 の画分集計蛋白量は 94.86 mg で全体の 17.3% に相当した。

II. DEAE cellulose カラムによる成績

次に Sephadex G 200 カラムを使って得られた CPE 活性大なる部分 (No.14~No.26 の画分) を更に DEAE cellulose カラムを用いて画分を試みた。まず 0.1 M NaCl (0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0) で溶出し、ついで DEAE cellulose カラム吸着部分を 0.1 M~1.0 M NaCl の直線勾配で溶出した。これにより得られた画分の各々につき CPE 活性と蛋白濃度を測定した (Fig. 3)。CPE 活性は Y1 adrenal cell と Hela cell を用い、24 時間混合培養法と 5 分間接触法で検定した。その結果、2 種類の CPE 活性がある画分が次の如く判明した。

1. 0.1 M NaCl で溶出画分

1) 24 時間混合培養法による 2 種の細胞の CPE

Y1 adrenal cell と Hela cell に有意差を認めなかった。即ち、両細胞とも RCD はピークを 1 峰性に認め最大は No.12 の画分に RCD 8 を認め、形態変化は cytotoxicity 型であった。

2) 5 分間接触法による 2 種の細胞の CPE

Y1 adrenal cell に有意差を認めた。No.12 の画分では Y1 adrenal cell で RCD 6、Hela cell で RCD 1 を認めた。そして No.12 画分の 2.5 倍希釈液 5 分間接触法で Hela cell への CPE を認めない条件による Y1 adrenal cell の形態変化は、接触 4 時間後より出現し、18 時間後に完全に円形細胞化した。PBS で洗浄後組織培養用培地を添加し培養すると、復元傾向を認めた。これは大腸菌毒素でいわれている cytotoxicity 型¹⁴⁾¹⁵⁾を示し、cytotoxicity 型とは明らかに異なっていた (Fig. 4 b)。

3) 蛋白濃度はピークを 1 峰性に認め最大は No.12 の画分で absorbance 0.25 を示し、RCD のピークにほぼ一致していた。

2. 0.1 M~1.0 M NaCl の直線勾配での溶出画分

1) 24 時間混合培養法による 2 種の細胞の CPE

Y1 adrenal cell と Hela cell に有意差を認めなかった。即ち、両細胞とも RCD はピークを 1 峰性に認め、最大は NaCl Normality 0.45 M に位置する No.65 画分で RCD 16 を認め、形態変化は cytotoxicity 型であった。

2) 5 分間接触法による 2 種の細胞の CPE

Y1 adrenal cell と Hela cell に有意差を認めなかった。即ち、両細胞とも RCD はピークを 1 峰性に認め、最大は No.64 の画分で Y1 adrenal cell が RCD 10 を、Hela cell が RCD 9 を認め、形態変化は cytotoxicity

型であった。

3) 蛋白濃度はピークを 4 峰性に認め、最大は第 3 ピークに属する No.72 画分で absorbance 0.85 を示した。第 2 のピーク absorbance (280 nm) = 0.30 は RCD のピークにほぼ一致していた。

0.1 M NaCl での溶出画分と 0.1 M~1.0 M NaCl の直線勾配での溶出画分の両者とも、56°C 30 分加熱することにより CPE 活性が失活した。

III. その他の生物学的活性

以上、*C. difficile* toxin の精製過程で 2 画分の易熱性 CPE 活性を見出し、各々の代表として No.12 と No. 65 の画分を用い他の生物学的活性を測定した (Table 1)。

1. マウス致死活性

DDY 系雌マウスを用い尾静脈注射によるマウス致死

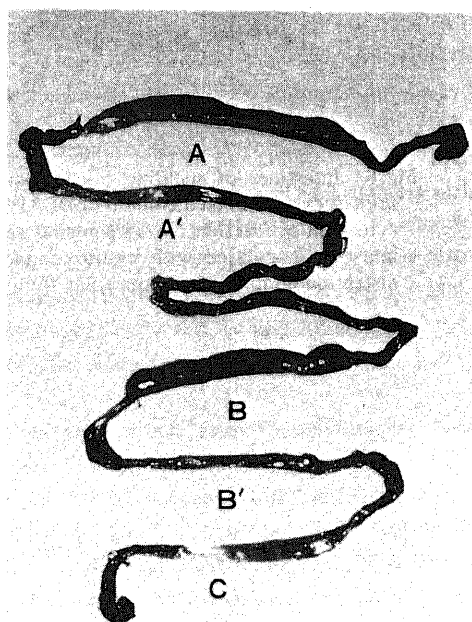


Fig. 5. Gross appearance, 18h after injection, of loops of rabbit small intestine isolated by ligatures and injected with partially purified *C. difficile* cytotoxin on a column of DEAE cellulose (Fig. 3). A, the loop injected with cytotoxin of fraction No. 12 containing watery transparent liquid; A', the loop injected with cytotoxin of fraction No. 12 preheated at 56°C for 30min showing no change; B, the loop injected with cytotoxin of fraction No. 65 containing dark color liquid with blood; B', the loop injected with cytotoxin of fraction No. 65 preheated at 56°C for 30min showing no change; C, negative control.

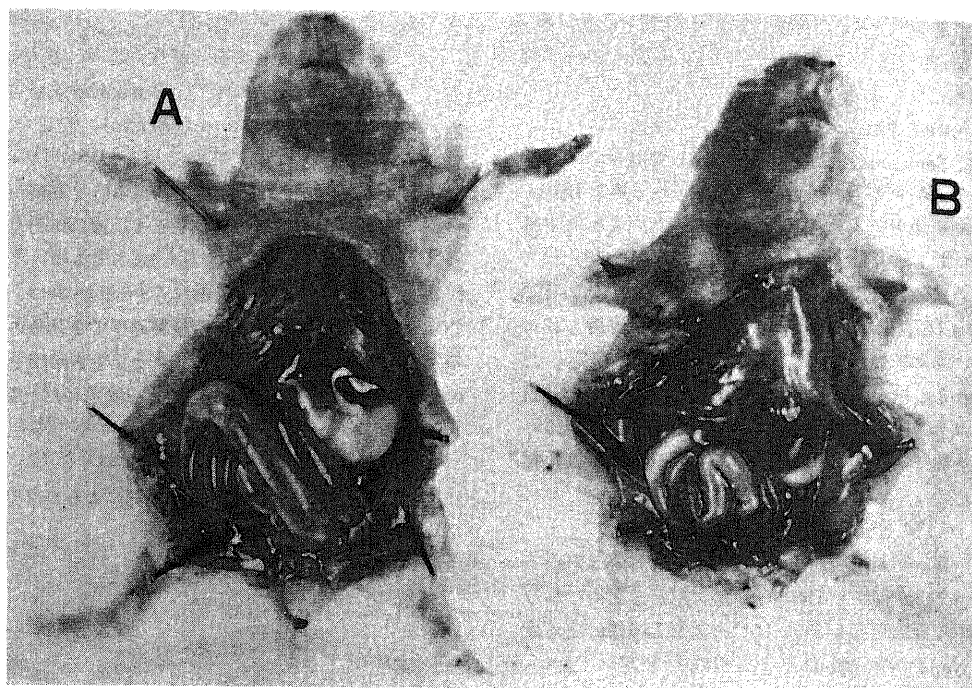


Fig. 6. Intestines of suckling mice inoculated 5h previously with partially purified *C. difficile* cytotoxin on a column of DEAE cellulose (Fig. 3). A, the intestine inoculated with cytotoxin of fraction No. 12 showing positive change, distention with clear fluid; B, the intestine inoculated with cytotoxin of fraction No. 65 showing negative change, no distention containing darker color fluid due to the normal content of bile.

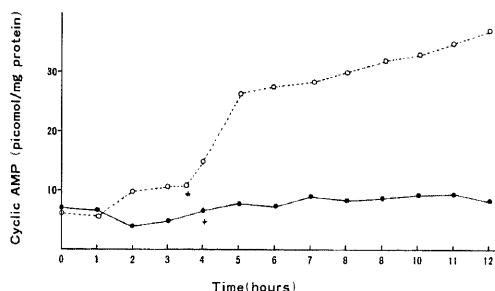


Fig. 7. Cyclic AMP in Y1 adrenal cells treated with partially purified *C. difficile* cytotoxin on a column of DEAE cellulose (Fig. 3). Symbols: ○—○, fraction No. 12; ●—●, fraction No. 65; *, beginning point of cytopathic effect.

活性の測定を行った。その結果、No.12の画分は 10^3 倍希釈までマウス致死活性を認め、No.65の画分は10倍希釈まで認めた。

2. ウサギ小腸結紮ループ法

体重1.5~2.0 kgの雄白ウサギを用いて小腸結紮ループ法による毒素活性を調べた。両者とも 10^3 倍希釈まで体液貯留を認めたが性状が異なり、No.12の画分は血

液を全く含まない水様性の貯留液を認め、No.65画分は血液混入の暗赤色貯留液を認めた (Fig. 5)。

3. 乳飲みマウスの体液貯留法

胃内へ経口的注入により腸内の体液貯留を調べた。その結果、No.12とNo.65の画分両者とも 10^2 倍希釈まで乳飲みマウスの致死を認めたが、 10^3 倍希釈では両者とも乳飲みマウスの致死を認めなかった。そして、前者にのみ体液貯留を認めた (Fig. 6)。

4. Cyclic AMP (Fig. 7)

YAMASA Cyclic AMP Assay Kit (RI法)を用いY1 adrenal cell接触によるcyclic AMPの上昇を調べた。その結果、No.12の画分にはみ有意な増加を認めた。即ち、3時間半頃にY1 adrenal cellが円形細胞化し、その頃からcyclic AMPが急激に増加しはじめ、5時間めよりなだらかな増加とかわり12時間めのcyclic AMPの量は38 pico mol/mg proteinを示した。一方No.65の画分はCPEを認めたが有意な増加を認めず12時間目のcyclic AMPの量は8 pico mol/mg proteinを示した。

以上により、2画分の易熱性のCPE活性は、in vivoでも同様に異なる毒素活性を有し且つcyclic AMP産出

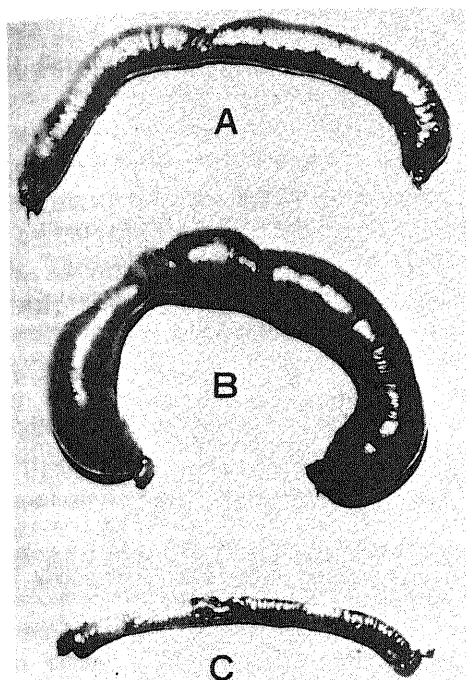


Fig. 8. Gross appearance, 18h after injection, of loops of rabbit small intestine isolated by ligatures and injected with crude toxin of *C. difficile*. A, the loop injected with crude toxin of *C. difficile* KZ 57 containing watery transparent liquid; B, the loop injected with crude toxin of *C. difficile* KZ 101 containing dark color liquid with blood; C, negative control.

の差異をも有していることが判明した。また、予備実験的に KZ 57 株と KZ 101 株の粗毒素液 1.0 ml を用いウサギ小腸結紮ループ法を行った。その結果 No.12 と No.65 画分によるものと同様に前者に血液を含まない水様性の体液貯留を認め、後者に血液混入の暗赤色体液貯留を認める成績を得た (Fig. 8)。

考 察

人の抗生剤による偽膜性腸炎や重症下痢症に *C. difficile* toxin 証明の報告がなされるようになってから、組織培養細胞の変性致死を指標として *C. difficile* toxin の精製が進められ、性状に関してもかなり詳しく報告されるようになった^{10)~12)}。また、本来の病原性を反映している *in vivo* 系を併用しての毒素活性の検討もされるようになった。しかし、その下痢発症の機序に関しては解明が行われていない。

この研究では、まず *C. difficile* を BHI broth で特に嫌気性の処理を行わず大気下 37°C 5 日間の静置培養

を行い、これにより毒素産生を容易にした。また、KZ 57 株と KZ 101 株の粗毒素液を用い ILT を施行すると、CPE はともに RCD 8 にもかかわらず、前者により水様性の貯留液を認め後者により血液混入の暗赤色貯留液を認めた。株の相違により性状の異なる体液貯留を認めるというこの事実に着眼し、*Escherichia coli* の toxic products の差異によって異なる細胞形態変化²⁴⁾を示す 2 種の細胞 (Y1 adrenal cell, Hela cell) を指標として、*C. difficile* (ATCC 17859) の粗毒素液の部分精製を行った。その結果、DEAE cellulose カラムにより 0.1 M NaCl での溶出画分と 0.45 M NaCl での溶出画分の 2 つに分れて毒素画分が得られ、惹起させる細胞形態変化の差異として前者は cytotoxicity 型を示し、後者は cytotoxicity 型を示した。また前者にのみ cyclic AMP の有意な産出誘導能を認めた。即ち、cytotoxicity 型を示す毒素が Y1 adrenal cell 表面の receptor に結合し、その内側の adenylate cyclase を活性化し ATP から cyclic AMP を合成し²¹⁾、その結果 *in vivo* では ILT での水様性体液貯留と suckling mouse assay での体液貯留を認めるものと思われる。この反応は易熱性の点でも *E. coli* の heat-labile toxin (以下 *E. coli* - LT と略) に類似するが、*E. coli* - LT の場合は suckling mouse assay で体液貯留を認めないという点でこの毒素と異なる。一方 cytotoxicity 型を示す毒素は cyclic AMP に関与しない細胞致死性で、その結果 *in vivo* では ILT で血液混入の暗赤色体液貯留を認めるが suckling mouse assay で体液貯留を認めないものと思われる。

Suckling mouse assay¹⁸⁾は従来 *E. coli* の heat-stable toxin (以下 *E. coli* - ST と略; *E. coli* - LT と異なり作用機序に cyclic AMP の関与を認めない) の検定に用いられており、*E. coli* - LT には体液貯留を認めないが、heat labile toxin でも *C. difficile* toxin の場合は cyclic AMP が関与しているものに体液貯留が認められたことは、*E. coli* - LT と *C. difficile* toxin の作用機序に異なる点のあることを推察させる。また、マウス致死活性は cytotoxicity 型と cytotoxicity 型のいずれでも認めるが、CPE 値の低い前者の方に高く認めた。このことから両者各々異なる機序でマウス致死活性を示すものと思われる。いずれにせよ、我々のところに認めた No.12 と No.65 の *C. difficile* toxin は上野らの D-1 と D-2 toxin¹²⁾、Taylor らの peak I と peak II toxin¹¹⁾の各々に近いと思われるが、若干異なる部分 (例えば No.65 toxin の ILT 活性の残存) も観察された。これは部分精製の各段階に用いられた方法の差、または使用菌株の差によるものかもしれないが、さらに今後、検討の余地を残している。

Sephadex G 200 によるゲルろ過後の毒素は cytotoxicity 型を示したが、これは cytotoxicity 型の CPE 活性が cytotoxicity 型のより強力なため、cytotoxicity 型の CPE 活性がマスクされたものと考えられる。すなわち、さらに DEAE cellulose カラムで分画すると、cytotoxicity 型と cytotoxicity 型を示す 2 種の CPE 活性画分に分離され、しかも前者が後者よりも RCD が大なることからもうかがわれる。

また、KZ 57 株と KZ 101 株の株の相異による ILT での体液貯留の差異は cytotoxicity 型と cytotoxicity 型のうちどちらが優位を占めるかにより説明しようように思われる。

同様な意味で、抗生剤による下痢発症時に、*C. difficile* toxin を認めた場合、水様性下痢を認める enterocolitis が粘血便混入の下痢を認める pseudomembranous colitis かあるいは両者の混在かは、cytotoxicity 型と cytotoxicity 型のうちどちらの毒素産生が優位を占めるかにより規定される可能性が示唆される。

結 論

I. *C. difficile* (ATCC 17859) を BHI broth で特に嫌気性の処理を行わず大気下 37°C 5 日間静置培養し、これより得た粗毒素液を濃縮後 Sephadex G 200 カラムでゲルろ過した。得られた各々の画分につき、Y1 adrenal cell と Hela cell を用い 24 時間混合培養法で CPE 活性を調べると、いずれも 1 峰性のピークを認め且つ cytotoxicity 型を示した。この CPE 活性大なる画分を集め、更に DEAE cellulose カラムを用いて分画を試みた。まず 0.1 M NaCl で溶出し、ついで 0.1 M ~ 1.0 M NaCl の直線勾配で溶出した。これにより得られた各々の画分につき再び両細胞を用い CPE 活性を測定した。24 時間混合培養法ではいずれも cytotoxicity 型を示したが、5 分間接触法では 0.1 M NaCl での溶出画分は cytotoxicity 型を示し、0.1 M ~ 1.0 M NaCl の直線勾配での溶出画分は cytotoxicity 型を示した。また両 CPE 活性とも 56°C 30 分加熱により失活した。そこでこの 2 つの易熱性 CPE 活性の代表画分を用い他の生物学的活性を比較検討し次の成績を得た。

1) マウス致死性は、cytotoxicity 型毒素分画(以下 cytotoxicity 型と略)と cytotoxicity 型毒素分画(以下 cytotoxicity 型と略)の両者に認めるが、前者により高かった。

2) ウサギ小腸結紮ループ法は cytotoxicity 型に血液混入を認めない水様性の体液貯留を認めたが、cytotoxicity 型に血液混入の暗赤色体液貯留を認めた。

3) 乳飲みマウス法による体液貯留は、cytotoxicity

型にのみ認めた。

4) Y1 adrenal cell による cyclic AMP 産出は cytotoxicity 型にのみ有意な増加を認めた。

II. *C. difficile* の KZ 57 株と KZ 101 株の粗毒素液を用いウサギ小腸結紮ループ法を行うと、前者に血液を含まない水様性体液貯留を認め、後者に血液混入の暗赤色体液貯留を認めた。これらの成績から、感染した *C. difficile* の産生毒素が cytotoxicity 型と cytotoxicity 型のどちらの活性を多く示すかにより、臨床像が修飾される可能性が示唆される。

謝 辞

この研究に御指導と御校閲を賜りました谷口昂教授に深謝いたします。また、常に多大な御協力と御指導をいただいた西田直己助手をはじめとする小児科第七研究室の諸兄、奥田則彦講師、試供菌株の分与をはじめとした毒素液作製の御協力と細菌学的御指導をいただいた微生物学教室の西田尚紀教授と中村信一助教授、組織培養をはじめとした多大な御指導をいただいた金沢大学癌研究所ウィルス部の波田野基一教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Bartlett, J. G., Onderdonk, A. B., Cisneros, R. L. & Kasper, D. L.: Clindamycin - associated colitis due to toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. *J. Infect. Dis.*, 136, 701 - 705 (1977).
- 2) Larson, H. E. & Price, A. B.: Pseudomembranous colitis: presence of clostridial toxin. *Lancet*, ii, 1312 - 1314 (1977).
- 3) Larson, H. E., Parry, J. V., Price, A. B., Polby, J. & Tyrell, D. A. J.: Underdescribed toxin in pseudomembranous colitis. *Br. Med. J.*, i, 1246 - 1248 (1977).
- 4) Chang, T. W., Bartlett, J. G. Gorbach, S. L. & Onderdonk, A. B.: Clindamycin - induced enterocolitis in hamsters as a model of pseudomembranous colitis in patients. *Infect. Immun.*, 20, 526 - 529 (1978).
- 5) Marrie, T. J., Faulkner, R. S., Bradley, B. W. D., Hartlen, M. R., Comeau, S. A. & Miller, H. R.: Pseudomembranous colitis: isolation of two species of cytotoxic clostridia and successful treatment with vancomycin. *Can. Med. Assoc. J.*, 119, 1058 - 1060 (1978).
- 6) Bartlett, J. G., Chang, T. W., Gurwith, M., Gorbach, S. L. & Onderdonk, A. B.: Antibiotic associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N. Engl. J. Med.*, 298, 531 - 534

(1978).

7) Bartlett, J. G., Moon, N., Chang, T. W., Taylor, N. & Onderdork, A. B.: The role of *Clostridium difficile* in antibiotic associated pseudo-membranous colitis. *Gastroenterology*, **75**, 778 - 782 (1978).

8) George, W. L., Sutter, V. L. & Finegold, S. M.: Toxigenicity and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile*. A cause of antimicrobial agent - associated colitis. *Curr. Microbiol.*, **1**, 55 - 58 (1978).

9) Wada, N., Nishida, N., Iwaki, S., Ohi, H., Miyawaki, T., Taniguchi, N. & Migita, S.: Neutralizing activity against *Clostridium difficile* toxin in the supernatants of cultured colostrual cells. *Infect. Immun.*, **29**, 545 - 550 (1980).

10) Rolfe, R. D. & Finegold, S. M.: Purification and characterization of *Clostridium difficile* toxin. *Infect. Immun.*, **25**, 191 - 201 (1979).

11) Taylor, N. S., Thorne, G. M. & Bartlett, J. G.: Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.*, **34**, 1036 - 1043 (1981).

12) 小林とよ子・渡辺邦友・上野一恵・坂野恵子・野沢義則: *Clostridium difficile* の2種類の易熱性毒素の精製と性状に関する研究. 第11回嫌気性菌感染症研究会講演集, 208 - 215 (1981).

13) Sack, D. A. & Sack, B. B.: Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using Y1 adrenal cells in miniculture. *Infect. Immun.*, **11**, 334 - 336 (1975).

14) Konowalchuk, J. & Speirs, J. I.: Response of various cell lines to *Escherichia coli* toxic products.

Can. J. Microbiol., **25**, 335 - 339 (1979).

15) Cumberbatch, N., Gurwith, M. G., Langston, C., Sack, R. B. & Brunton, J. L.: Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*: relationship of toxigenic isolates to diarrheal disease. *Infect. Immun.*, **23**, 829 - 837 (1979).

16) De, S. N., Ghose, M. L. & Sen, A.: Activities of bacteria free preparations from *Vibrio cholera*. *J. Path. Bact.*, **79**, 373 - 380 (1960).

17) 渡部礼二・中村英夫・木谷洋・西田直己・高橋謙太郎・中島博徳: 下痢症患者より分離された Coliforms の Enterotoxin 産生に関する研究. 日本小児科学会雑誌, **81**, 932 - 939 (1977).

18) Giannella, R. A.: Suckling mouse model for detection of heat stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model. *Infect. Immun.*, **14**, 95 - 99 (1976).

19) Dean, A. G., Ching, Yi - Chuan, Williams, R. G. & Harden, L. B.: Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, **125**, 407 - 411 (1972).

20) Frandsen, E. K. & Krishna, G.: A simple ultrasensitive method for the assay of cyclic AMP and cyclic GMP in tissues. *Life Sci.*, **18**, 529 - 542 (1976).

21) Kwan, C. N. & Wishnow, R. M.: *Escherichia coli* enterotoxin induced steroidogenesis in cultured adrenal tumor cells. *Infect. Immun.*, **10**, 146 - 151 (1974).

Partial Purification and Biological Characteristics of Heat Labile Cytotoxin of *Clostridium difficile* Susumu Iwaki, Department of Pediatrics (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920. —*J. Jusen Med. Soc.*, **91**, 714 - 726 (1982)

Key words: *C. difficile* toxin, Heat labile toxin, Cytotonicity type, Cytotoxicity type, Cyclic AMP.

Abstract

To elucidate the mechanism of diarrhea due to *C. difficile*, the purification of *C. difficile* ATCC 17859 toxin after cultivation of bacterium cells in brain heart infusion broth at 37°C under the atmosphere for 5 days was tried. The supernatant was subjected to the experiment as a crude toxin. After concentration, the cytopathic effect (hereinafter referred to as CPE) active substances on Y1 adrenal and Hela cells were partially purified. A follow-up study of the

cytomorphological changes due to this toxin revealed an interesting fact on the mechanism of diarrhea. After gel filtration of the crude toxin fluid by Sephadex G 200 column, fractions with large CPE activity were processed by diethylaminoethyl-cellulose column, and the CPE activity was observed on the portion eluted with 0.1M NaCl (fraction I) and on the portion eluted with linear gradient of 0.1M to 1.0M NaCl (fraction II), respectively. Cytomorphologically, fraction I showed the CPE activity of a cytotoxicity type on Y1 adrenal cells, although the CPE was not observed on Hela cells: the rounding of Y1 adrenal cells occurred upon 5 min agitation but the CPE was restored by the exchange of the medium. On the contrary, fraction II showed the CPE of cytotoxicity type: pyknotic nuclei, loss of adherence and cell shrinkage observed on both cells were not restored by the exchange of the medium. Fraction I showed a cyclic AMP production on Y1 adrenal cells and a retention of watery transparent liquid by small intestinal ligation loop test in rabbits as well as a liquid retention in suckling mice *in vivo* system, while fraction II showed a retention of blood-containing dark red liquid by the above loop test, negative cyclic AMP production and negative results in suckling mice. Both of them showed a lethal activity with mice: the toxicity was higher in fraction I than in fraction II. The toxicity was heat labile: it was inactivated by heating at 56°C for 30 min. It is suggested that the clinical picture due to the infection with *C. difficile* may be modified by the two types of toxicity; cytotoxicity and cytotoxicity.